

Wanessa Michelle silva

**Achados clínicos e laboratoriais em cães naturalmente infectados pela
*Ehrlichia canis***

Recife-PE

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Wanessa Michelle Silva

**Aspectos clínicos e laboratoriais em cães naturalmente infectados pela
*Ehrlichia canis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Evilda Rodrigues de Lima
Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa Carla Lima da Silva

Recife-PE

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Dissertação elaborada por

Wanessa Michelle Silva

Aprovada em 22/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Evilda Rodrigues de Lima

Orientadora-Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Profa. Dra. Vanessa Carla Lima da Silva

Co-Orientadora-Centro Universitário Unifavip/Wyden

Profa. Dra. Melânia Loureiro Marinho

Departamento de Medicina Veterinária da UFCG

Profa. Dra. Miriam Nogueira Teixeira

Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Josefa Silva a meu pai José Manoel da Silva e meu irmão Leandro Silva.

A minha orientadora Evilda Rodrigues de Lima e coorientadora Vanessa Carla Lima da Silva que nunca desistiram de mim e me incentivaram a realizar este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir concluir mais esta etapa de minha vida por ter me concebido a vitória de ter sido aprovada, por ter me dado saúde para que eu pudesse realizar tudo que foi me proposto e transpor todos os obstáculos que surgiram ao longo desta caminhada.

Agradeço aos meus pais por toda base que foi dada em minha vida. Sem eles eu não seria nada nem teria chegado aonde cheguei, pois ainda que um pequeno grão de areia hoje, este trabalho representa e me torna mais forte fazendo-me desejar ser um deserto.

A minha querida mãe que nunca me desampara, que sempre cobra mais e mais de mim, pois quer ver seu fruto sempre em um lugar melhor, alto e longe das intempéries da vida.

Agracedida para toda vida a minha orientadora Professora Evilda Rodrigues de Lima que me estendeu a mão quando eu mais precisei, que me protegeu, defendeu e que muitas vezes quando eu fraquejei em objetivos ela esteve presente e sólida por mim. Tenho certeza de que deus me deu a melhor professora, pois nela existem todas as características de uma leoa que defende suas crias mesmo sabendo que no final da luta ela pode estar sozinha, no entanto ela não desiste.

A minha querida Co-orientadora Professora Vanessa Carla Lima da Silva que com sua linda voz de seda e com seu sorriso sempre estampado no rosto esteve ali suavizando e tornando mais leve os dias para mim.

A todos os integrantes de minha banca que com todo carinho e paciência contribuíram na execução de minha pesquisa, construção e correção de meu querido trabalho. A minha amiga Barbara nogueira que me ajudou com toda parte burocrática.

Ao querido professor de estatística Edmilsson Mazza que com carinho fez toda minha análise estatística, assim como a minha querida amiga patologista clínica veterinária, Telga Lucena Craveiro que com muita dedicação realizou todos os meus exames.

Agradeço também a universidade pela oportunidade que foi me dada e pelo fomento que foi me dado pelo CNPQ onde me ajudou nas pesquisas e no desenvolvimento dos estudos.

**“Nunca saberemos o quão forte somos até que ser forte seja a única
escolha”.**

RESUMO

Diante da importância e da alta prevalência da erlichiose na clínica médica de pequenos animais, foram avaliados 20 cães de ambos os sexos, variadas raças, idades e naturalmente infectados pela *Ehrlichia canis* que apresentaram sinais clínicos sugestivos da doença e positivos ao teste sorológico como método diagnóstico, atendidos no Hospital Veterinário da Prefeitura de Recife-PE no período de setembro de 2017 a maio de 2018. Foram coletados 4 ml de sangue sendo utilizados 1,5 ml para o teste sorológico e hemograma e 2,5 ml para a análise bioquímica. 75% dos animais apresentaram apatia, 50% vômito, 45% secreção ocular e 5% distúrbio hemorrágico. Os valores para hemácias, hemoglobina e hematócrito foram abaixo dos valores de referência, contudo ocorreu uma variabilidade elevada nas variáveis bastonetes e eosinófilos, com valores dos desvios padrão superiores às médias correspondentes, e valores razoavelmente elevados no desvio padrão, nas variáveis segmentados, linfócitos e monócitos. Para as variáveis (PPT, ureia, ALT, AST, FA, e Fósforo) verificou-se que os resultados apresentaram-se dentro dos valores de referência. No entanto, a variabilidade se mostrou elevada na fosfatase alcalina com valor do desvio padrão superior à média correspondente e foram razoavelmente elevadas nas variáveis uréia, creatinina e AST. As proteínas plasmáticas totais encontraram-se elevadas em 55% dos pacientes, seguido da ureia com 20%, ALT, FA e fósforo cada um com 15%. Valores inferiores à referência foram registrados em 50% dos pacientes com relação ao cálcio, 35% na albumina e 5% fósforo. Nas demais variáveis a maioria dos pacientes foi classificada com valor normal. Conclui-se que os sinais clínicos e alterações laboratoriais encontrados nos cães naturalmente infectados pela *Ehrlichia canis* não são sinais específicos para diagnóstico da doença sendo necessário utilizar outros meios como ferramenta diagnóstica.

Palavras-chaves: *Rhipicephalus sanguineus*; sorologia; diagnóstico; erliquiose; caninos.

ABSTRACT

In view of the importance and the high prevalence of erlichiosis in the clinical practice of small animals, we evaluated 20 dogs of both sexes, several breeds, ages and naturally infected by *Ehrlichia canis*, which presented clinical signs suggestive of the disease and positive to the serological test as diagnostic method, attended at the Veterinary Hospital of the Municipality of Recife, PE, Brazil, from September 2017 to May 2018. Four ml of blood were collected, using 1.5 ml for the serological test and the blood count and 2.5 ml for the biochemical analysis. 75% of the animals presented apathy, 50% vomiting, 45% ocular secretion and 5% hemorrhagic disorder. The values for red blood cells, hemoglobin and hematocrit were below the reference values, however, there was a high variability in rod and eosinophil variables, with values of standard deviations higher than the corresponding mean values, and fairly high values in the standard deviation, segmented variables, lymphocytes and monocytes. For the variables (PPT, urea, ALT, AST, FA, and Phosphorus) the results were found to be within the reference values. However, the variability was elevated in alkaline phosphatase with a standard deviation value higher than the corresponding mean and were reasonably high in the urea, creatinine and AST variables. Total plasma proteins were elevated in 55% of patients, followed by 20% urea, ALT, FA and phosphorus, each with 15%. Values lower than the reference were recorded in 50% of patients with respect to calcium, 35% in albumin and 5% phosphorus. In the other variables, the majority of patients were classified as normal. It is concluded that the clinical signs and laboratory abnormalities found in dogs naturally infected by *Ehrlichia canis* are not specific signs for the diagnosis of the disease and other means must be used as a diagnostic tool.

Key words : *Rhipicephalus sanguineus*; serology; diagnosis; erythemia; canine.

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1 - <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . | 18 |
| Figura 2 - Ciclo do <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | 18 |
| Figura 3 - Hospedeiro Definitivo | 19 |
| Figura 4 - Fisiopatogenia da infecção pela <i>Ehrlichia canis</i> em um canino | 20 |
| Figura 5 - Cão com Epistaxe | 22 |
| Figura 6 - Animal com secreção ocular | 23 |
| Figura 7 - SNAP® da IDEXX | 29 |

LISTA DE TABELAS

Página

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 1- | Resultados em valores absolutos e relativos da sintomatologia clínica de cães naturalmente infectados e positivos na sorologia para <i>Ehrlichia canis</i> | 36 |
| Tabela 2- | Resultados do perfil hematológico de cães naturalmente infectados e positivos na sorologia para <i>Ehrlichia canis</i> | 37 |
| Tabela 3- | Perfil bioquímico de cães naturalmente infectados e positivos sorologicamente pela <i>Ehrlichia canis</i> . | 41 |
| Tabela 4- | Valores absolutos e relativos segundo a classificação das variáveis PPT, ureia, creatinina, ALT, AST, FA, albumina, Ca e fósforo de Cães naturalmente infectados e positivos sorologicamente pela <i>Ehrlichia canis</i> . | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT – Alanina aminotransferase

AST- Aspartato aminotransferase

CEUA- Comissão de Ética no uso de animais

EMC- Erliquiose monocítica canina

FA- Fosfatase alcalina

PCR - Reação em cadeia de polimerase

PPT- Proteínas plasmáticas totais

UFRPE- Universidade Federal Rural de Pernambuco

VCM- volume Corpuscular Médio

CHCM- Concentração Hemoglobina Corpuscular Media

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 OBJETIVOS GERAIS | 15 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS | 15 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 3.1 HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES | 16 |
| 3.2 ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA | 16 |
| 3.3 O HOSPEDEIRO INVERTEBRADO | 17 |
| 3.4 O HOSPEDEIRO DEFINITIVO | 17 |
| 3.5 FISIOPATOGENIA | 19 |
| 3.6 SINAIS CLÍNICOS E FASES DA DOENÇA | 21 |
| 3.7 FATORES DE RISCO E EPIDEMIOLOGIA | 23 |
| 3.8 ANÁLISE HEMATOLÓGICA | 24 |
| 3.9 ANÁLISE BIOQUÍMICA | 26 |
| 3.10 DIAGNÓSTICO | 27 |
| 3.11 TRATAMENTO | 30 |
| 3.12 PROFILAXIA | 31 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 4.1 ANIMAIS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO | 32 |
| 4.1.1 Comissão de Ética | 32 |
| 4.2 COLETA DE SANGUE | 33 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 4.3 HEMOGRAMA | 33 |
| 4.4 BIOQUIMICA SÉRICA | 33 |
| 4.5 SOROLOGIA | 33 |
| 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 34 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 7 CONCLUSÃO | 45 |
| 7 REFERÊNCIA | 46 |

1 INTRODUÇÃO

A erliquiose canina, comumente denominada erliquiose monocítica canina (EMC) é doença infecciosa causada por uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória de monócitos, denominada *Ehrlichia canis*, pertence à família *anaplasmataceae*, na qual o gênero *Ehrlichia* foi incluído a partir de 2001, havendo sido retirado da família *Rickettsiaceae* (GREENE, 2012).

Possui distribuição mundial relatada em todo território brasileiro, sendo endêmica nas regiões Tropical e Subtropical e é relatada em todo território brasileiro. Necessita de vetores para ser transmitida, sendo o carrapato marrom, *Rhipicephalus sanguineus*, o mais comum envolvido na transmissão através de sua saliva no momento do repasto sanguíneo. Os carrapatos adultos poderão transmitir a enfermidade por até 155 dias após se infectar (GREENE, 2012).

O *Rhipicephalus* se infecta ao ingerir sangue de cães doentes e a doença pode ser transmitida em qualquer fase de sua vida. As bactérias ao serem ingeridas pelo hospedeiro invertebrado se espalham pelo organismo do carrapato (TAYLOR et al., 2010). Uma vez infectado com *Ehrlichia canis*, a doença no cão pode progredir para três fases: aguda, subclínica e crônica (NEER, 1998). A fase aguda dura de 2 a 4 semanas e as principais manifestações clínicas incluem febre, anorexia, perda de peso, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, lesões oftalmológicas, desordens respiratórias, desordens gastrointestinais como vômito e diarreia, além de uma grande variedade de sinais neurológicos (HARRUS et al., 2000; MYLONAKIS, 2014).

Alterações hemostáticas como epistaxe, hematúria e diarreia hemorrágica também são comuns (BULLA, 2004). A alteração hematológica mais frequente é a trombocitopenia, em aproximadamente 84% dos casos. Outros achados são anemia normocítica normocrômica e leucopenia, sendo também comum hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (BORIN, 2009).

Na fase subclínica se inicia de 3 a 6 semanas após a infecção com ausência de sinais clínicos. Achados laboratoriais incluem trombocitopenia, leucopenia e anemia não-regenerativa (VILLAESCUSA et al., 2012). Na fase crônica os sinais clínicos são similares aos da fase aguda, porém mais graves (WANER et al., 1995). O envolvimento da medula óssea na fase crônica e a incapacidade do animal de montar uma resposta imune efetiva levam à pancitopenia (HARRUS et al., 2000).

É importante salientar, no entanto, que em uma infecção natural normalmente essas fases não são bem distinguíveis. O diagnóstico da erliquiose canina é feito baseado na associação dos achados clínicos, provas laboratoriais, sorológicas e moleculares. Desta forma, quanto mais precoce for o diagnóstico, melhores são as condições de se realizar um tratamento adequado da doença (MUNHOZ et al., 2012).

Há pouca informação quanto a evolução dos achados clínicos, hematológicos e bioquímicos em cães naturalmente infectados por um ou mais patógenos transmitidos por vetores (CARDOSO et al., 2008; BANETH et al., 2009; SCHETTERS et al., 2009). Em locais onde a circulação de mais de um agente patogênico transmitido por carrapatos é importante realizar o diagnóstico definitivo, uma vez que alguns desses agentes podem provocar alterações clínicas inespecíficas e muitas vezes mais severas, o que pode dificultar o diagnóstico, tratamento e a resposta do animal a terapia.

Diante da importância e da alta prevalência dessa enfermidade na clínica médica de pequenos animais, propôs-se avaliar cães acometidos pela *Ehrlichia canis* utilizando a sorologia como método diagnóstico e correlacionar os achados clínicos, laboratoriais de hematologia, bioquímica sérica de animais naturalmente infectados atendidos no Hospital Veterinário do Recife-PE.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os aspectos clínicos e laboratoriais de cães naturalmente infectados pela *Ehrlichia canis* e sorologicamente positivos, atendidos no Hospital Veterinário da Prefeitura de Recife- PE.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar clinicamente os cães naturalmente infectados pela *Ehrlichia canis*.
- Realizar hemograma e exames bioquímicos (ALT, AST, FA, uréia, creatinina, fósforo e cálcio) de cães naturalmente infectados pela *Ehrlichia canis*.
- Avaliar a frequência de cães naturalmente infectados pela *Ehrlichia canis* determinado pelo método sorológico

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico e Importância das Doenças Transmitidas por Vetores

As doenças infecciosas transmitidas por vetores artrópodes são reemergentes em todo o mundo, devido às mudanças climáticas e ao acesso a outros nichos ecológicos que não os habituais, constituindo um grande desafio na medicina humana e veterinária. A proximidade entre os animais selvagens cativos, domésticos e humanos auxilia na transmissão de parasitas e amplia os potenciais reservatórios. Algumas espécies de Rickettsiales têm grande importância como causadores de doenças, tais como *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* (ALLISON, 2013), *Rickettsia rickettsii* (LABRUNA 2009; FORTES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2017), *R. parkerii*, *R. felis*, *R. typhi* (FORTES et al., 2011) e *A. phagocytophilum* (VIEIRA et al, 2011).

3.2 Erliquiose Monocítica Canina

A erliquiose Monocítica Canina (EMC) é causada pela bactéria da ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, gênero *Ehrlichia*, espécie *Ehrlichia canis*. A prevalência desta infecção é alta em regiões tropicais e subtropicais e está distribuída em todos os continentes com exceção da Austrália. Há alguns relatos de casos de erliquiose monocítica humana sendo a *E. canis* o agente etiológico (MCVEY et al., 2016). Também conhecida como pancitopenia canina tropical, febre hemorrágica canina ou tifo canino, é considerado parasita intracelular obrigatório das células mononucleares (SILVA, 2015), atualmente compreende cinco espécies de bactérias Gram-negativas, sendo elas, a *Ehrlichia ruminantium*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. canis* (GREENE, 2012).

A erliquiose tem sido reconhecida como uma das mais importantes doenças infecciosas transmitida por carrapatos, desde a guerra do Vietnã, por isso, é objeto de estudo por pesquisadores no mundo inteiro (RIKIHISA, 2011). A distribuição da doença coincide com a prevalência nas áreas do vetor *Rhipicephalus sanguineus*, ocorrendo durante épocas do ano de altas temperaturas, onde o vetor se torna mais ativo e abundante, embora possam ser relatadas ocorrências durante todo o ano, devido à existência de infecção persistente (SILVA, 2015).

No Brasil, a erliquiose foi observada pela primeira vez em Belo Horizonte, Minas Gerais (COSTA, 1973). No Rio de Janeiro, foi diagnosticada em cães da Polícia Militar (CARRILLO et al., 1976). Em 1985, foi encontrada em Santa Maria, Rio Grande do Sul, e em 1988 foi verificado

um caso clínico em Curitiba, Paraná (KAVINSKI et al., 1988). Esta doença é relatada em todo território brasileiro (BORIN et al., 2009; VIEIRA, 2011; SILVA, 2014).

3.3 O Hospedeiro invertebrado

O Rhipicephalus sanguineus (Figura 1) pertence ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Ordem Ixodida, Família Ixodidae e Gênero *Rhipicephalus* (BOWMAN, 2014).

Como características anatômicas, os exemplares de *Rhipicephalus sanguineus* têm a base do capítulo hexagonal, com olhos e festões, o escudo não é ornamentado. Eles passam por quatro estágios evolutivos durante o seu ciclo de vida - ovo, larva, ninfa e adulto (Figura 2) Assim que a larva eclode do ovo realiza o primeiro repasto sanguíneo no hospedeiro durante alguns dias, após a qual sofre processo de mudança do exoesqueleto para o próximo estágio evolutivo, a ninfa. Nesta segunda fase, após uma nova alimentação por alguns dias no hospedeiro, realiza uma nova mudança para o estágio adulto (SHAW, 2008). Os ixodídeos adultos diferenciam-se sexualmente, realizam o repasto sanguíneo no hospedeiro e copulam. Após a alimentação, a fêmea ingurgitada realiza uma única postura de ovos, morrendo em seguida (SHAW, 2008).

Este carrapato na sua classificação etológica é designado como sendo endófilo, monotrófico e de três hospedeiros, ou seja, está adaptado para viver em interiores de casas e edifícios, embora possa sobreviver em exteriores, o hospedeiro sempre é da mesma espécie e que em cada fase de sua vida requer uma alimentação num hospedeiro e posterior muda (DANTAS-TORRES, 2010).

3.4 O Hospedeiro definitivo

A bactéria tem a capacidade de infectar ruminantes, equídeos, felídeos, roedores, canídeos e até o homem, no entanto, os hospedeiros vertebrados mais comuns são os da família *Canidae*, onde se incluem os cães (Figura 3), os coiotes, as raposas e os chacais. Os cães em áreas endêmicas e aqueles que são transportados para estas regiões são naturalmente mais suscetíveis à doença, devido ao maior risco de exposição ao *Rhipicephalus sanguineus* infectado (SAINZ, 2006).



Figura 1- *Rhipicephalus sanguineus*.
 Fonte: Bistol University (2019)



Figura 2- Ciclo do *Rhipicephalus sanguineus*
 Fonte: Gutiérrez e Sánchez (2016)



Figura 3- HospedeiroDefinitivo

Fonte: Silva (2019).

3.5 Fisiopatogenia

O Rhipicephalus se infecta ao ingerir sangue de cães com infecção e a doença pode ser transmitida em qualquer fase do ciclo da vida do carrapato. As bactérias ao serem ingeridas pelo hospedeiro invertebrado se espalham, indo dos homócitos no intestino para a glândula salivar (TAYLOR et al., 2010). O momento da infecção ao canino ocorre na hora do repasto sanguíneo feito pelo carrapato infectado, que transmite a *Ehrlichia canis* ao hospedeiro vertebrado através de sua saliva (GREENE, 2012).

Após a inoculação da bactéria no cão (Figura 4), ela adere à membrana plasmática da célula e ocorre o invaginamento, com isso o microrganismo passa ao interior da célula onde fica em um vacúolo. Nas primeiras 48 horas que se seguem de incubação ocorre descoloração do citoplasma próximo ao núcleo e formação de corpos elementares com tamanhos de 0,2 a 0,6 μ m (FIGUEIREDO, 2011).

Em seguida, os corpos elementares aumentam em número e formam os corpos iniciais. Esses são inclusões de organismos pleomórficos imaturos que variam em tamanho de 0,5 a 2,0 μ m e aparenta corpos elementares aderidos. Após o sétimo e o décimo segundo dia de incubação as bactérias que se localizam no interior do vacúolo realizam replicação por divisão

binária formando inclusões intracelulares chamadas de mórula cujo tamanho varia de 1 a 2 μ m. A mórula é observada nos leucócitos na fase aguda da infecção, mas em pequeno número e por um curto período. As inclusões são liberadas na circulação quando ocorre o rompimento do monócito ou por exocitose (HARRUS, 2000).

Após a inoculação da bactéria no hospedeiro vertebrado segue o período de incubação que varia entre oito e vinte dias, após este período os sinais clínicos aparecem caracterizando a fase aguda da doença, podendo ainda se dividir em fases subclínica e crônica (NAKAGHI et al., 2008).

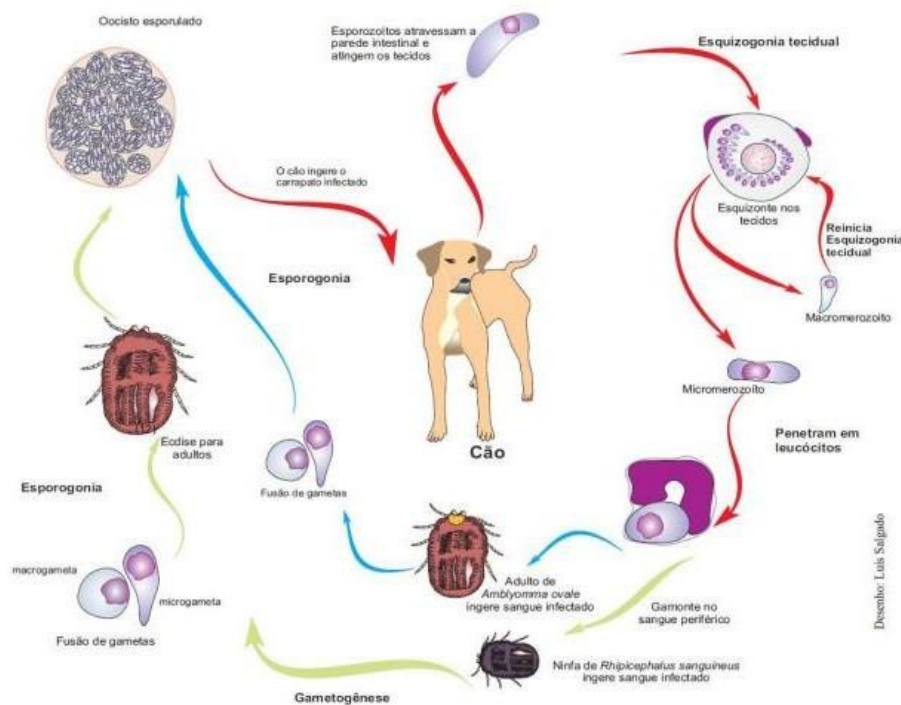


Figura 4- Fisiopatogenia da infecção pela *Ehrlichia canis* em um canino

Fonte: Gutiérrez e Sánchez (2016)

3.6 Sinais clínicos e fases da doença

Os cães infectados pela *Ehrlichia canis* podem apresentar sinais clínicos de severidade variada. Dependendo da fase da doença em que se encontram, o quadro clínico pode variar de severo até à inexistência de quaisquer sinais clínicos sendo os animais assintomáticos. A

gravidade da doença depende de diversos fatores: um deles é a capacidade imunológica do hospedeiro vertebrado e/ou a presença de outras agentes concomitantes, como outras parasitoses provocadas por ixodídeos (WANER, 2013).

Na fase aguda, que dura cerca de 2 a 4 semanas, os sinais clínicos apresentados pelo animal compreendem febre, anorexia, depressão, mucosas pálidas, hepatomegalia, esplenomegalia, vasculite, petéquias, equimoses, epistaxe (Figura 5), secreção ocular (Figura 6) e nasal serosa a mucopurulenta, linfadenomegalia, alterações neurológicas, musculares, oculares, poliartrite e sinais menos frequentes incluem diarreia, vômito, tosse e alopecia (FELDMAN, 2000; ORIA, 2001; NAKAGH, 2008).

A fase subclínica geralmente começa de 6 a 9 semanas pós-infecção, e os animais apresentam anemia não regenerativa, leucopenia, trombocitopenia, nesta fase não são observados sinais clínicos evidentes, podendo os animais permanecer por meses ou anos ocorrendo apenas alterações laboratoriais hematológicas, o que remete a importância de exames hematológicos e sorológicos periódicos (NELSON e COUTO, 2010).

A fase crônica pode compreender duas formas, consoante a forma desenvolvida, diferentes sinais clínicos aparecerão. Na fase crônica não mielossupressiva os sinais clínicos são vagos e por vezes semelhantes aos da fase aguda, prevalecendo apatia, depressão e perda de peso. Já a fase crônica mielossupressiva, caracteriza-se por um quadro bastante complexo. Os pacientes evidenciam anemia, trombocitopenia, leucopenia, supressão medular, emaciação, hemorragias frequentes, edema periférico, especialmente nos membros posteriores e escroto, hipotermia, estomatite ulcerativa, poliúria e polidipsia, glomerulonefrite, icterícia e piodermite. Ainda é possível a ocorrência de infecções secundárias, como pneumonia intersticial. Podem também ocorrer alterações na capacidade ou ciclo reprodutivo, incluindo prolongamento do corrimento sanguíneo no estro, infertilidade, aborto e morte neonatal (HALOS, 2015).

Várias anormalidades clínicas e clinicopatológicas manifestadas durante a fase crônica são devido às reações imunes contra o microrganismo intracelular (BIRCHARD e SHERDING, 2008; NELSON e COUTO, 2010). Os sinais podem ser brandos ou o animal pode até apresentar-se saudável e clinicamente sem alterações. Alguns cães podem apresentar artrite generalizada, devido ao depósito de imunocomplexos; a trombocitopenia moderada é comum e importante no estabelecimento de um diagnóstico conclusivo (LEGATZKI, 2002). Raramente, sinais como

uveíte anterior, opacidade corneana e artrites com sintomatologia discreta, moderada ou grave podem ser vistos nesta fase (OLIVEIRA et al., 2000; HARRUS e WANER, 2011).

Ocorre também hipoalbuminemia, por deposição de imunocomplexos ou imunoestimulação crônica (NELSON e COUTO, 2010). Harrus et al. (2001) descreveram a detecção de imunocomplexos 45 dias após a infecção em um cão do grupo de seis infectados experimentalmente pela *Ehrlichia canis* e Breitschwerdt (1997) relatou que a erliquiose provoca grande diversidade de alterações clínicas e condições patológicas suspeitas de serem relacionadas à formação de imunocomplexos ocasionando alterações como glomerulonefrites, uveíte e poliartrite. O progresso da fase crônica pode ser severo e grave, provocando eventualmente a morte do animal por infecção secundária ou por hemorragia. Portanto, o diagnóstico da doença antes que ela progrida é essencial para melhores perspectivas no prognóstico (NEER e HARRUS, 2006).

Segundo Nakaghi et al. (2008) a febre é frequente em cães infectados pela *E. canis*. Diniz et al. (2008) identificou lesão em miócitos cardíacos em população de cães naturalmente infectados pela *E. canis* onde estes cães em fase aguda apresentaram maior risco de desenvolverem lesão miocárdica do que outros cães doentes.



Figura 5- Cão com Epistaxe

Fonte: Torres (2016).



Figura 6- Animal com secreção ocular

Fonte: Torres (2016).

3.7 Fatores de risco e Epidemiologia

Aguiar et al. (2007) e Sousa et al. (2010) observaram que os fatores como sexo, raça e idade não são importantes na EMC, porém o parasitismo pelo *R. sanguineus* é apontado como principal fator de risco (AGUIAR et al., 2007). No entanto Azevedo et al. (2011) verificou que idade avançada, presença e contato com outros cães assim como exposição ao *R. sanguineus* são fatores de risco ao desenvolvimento da infecção.

A erliquiose canina é uma doença mundialmente distribuída em várias regiões geográficas, as quais incluem sudeste da Ásia, África, Europa, Índia, América Central e América do Norte. Isso tudo coincide com a prevalência nessas áreas do vetor (WOLDEHIWET e RISTIC, 1993). A doença parece ser endêmica em muitas regiões do Brasil (VIEIRA et al., 2011).

Nos estados brasileiros, os níveis de prevalência da doença podem variar de acordo com a distribuição do vetor, as condições climáticas, a população sob estudo, o comportamento animal seu habitat e até mesmo com a metodologia empregada na investigação do agente. Nos estados do Nordeste e do Sul, diferenças das taxas de prevalência podem ser atribuídas em parte a melhor adaptação do carrapato ao clima quente e úmido do que ao clima temperado (SILVA et al., 2014).

Foram relatados por Labarthe et al. (2003) e Moreira et al. (2003) que em hospitais e clínicas veterinárias das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil aproximadamente 20% dos cães atendidos são acometidos pela erliquiose. Na região Nordeste do Brasil, no município de Chapadinha, Estado do Maranhão, um estudo com métodos sorológicos e moleculares, objetivou revelar a exposição e infecção de agentes transmitidos por

carrapatos, comprovaram que 14,6% dos cães foram soros reagentes para *E. canis*. Em relação aos tipos de habitats zonas urbanas e rurais, foram demonstrados que a sororreatividade canina para *Ehrlichia canis* foi semelhante em ambas as áreas (COSTA et al., 2015).

Em países de clima temperado, tropical e subtropical a erliquiose é causada pela *E. canis*, coincidindo com a ocorrência do seu vetor, *Rhipicephalus sanguineus*. A *E. canis* é a principal espécie em cães no Brasil, embora infecção por *Ehrlichia ewingii* tenha, despertado suspeita em cães (VIEIRA et al., 2011).

3.8 Alterações Hematológicas

A bactéria infecta leucócitos mononucleares, podendo causar alterações hematológicas como trombocitopenia, pancitopenia e linfocitose (ALMOSNY, 1998; LITTLE, 2010; EBANI e BERTELLONI, 2014; MAIA et al., 2014). As principais alterações hematológicas verificadas em pacientes com erliquiose são leucopenia e anemia (HARRUS, 2012).

A trombocitopenia, evidenciada no hemograma, é clinicamente seguida pelo achado de hemorragias petequiais nas membranas, mucosas ou pele, decorrente da diminuição da meia-vida das plaquetas, resultante da sua destruição, em razão da estimulação do sistema imunológico, da cascata de coagulação e resposta inflamatória. A diminuição da produção de plaquetas pode ser por consequência da hipoplasia de medula e suas causas são variadas: por irradiação corporal total, medicamentos, toxinas, agentes infecciosos e neoplasias (BAKER, 2015).

A principal causa infecciosa de trombocitopenia em cães é a infecção pela *Ehrlichia canis* e menos comumente por *Anaplasma platys*. Estudos apontam que a erliquiose em seu estágio inicial causa destruição de plaquetas por mecanismos imunomediados, e no final da doença provoca a aplasia de medula óssea e por consequência a diminuição na produção de plaquetas (BAKER, 2015).

Na fase subclínica o achado hematológico mais comum também é a trombocitopenia, justificado pela superprodução de anticorpos anti-plaquetas devido à persistente presença e proliferação da *Ehrlichia canis*. Ainda nesta fase pode-se visualizar plaquetas aumentadas o que sugere medula óssea ativa e realizando trombocitopoiese. Nesta fase também pode-se observar uma ligeira neutropenia, no entanto, os cães não ficam leucopênicos ou intensamente neutropênicos. Estes achados podem sugerir a continuidade de variadas alterações patológicas, e que, portanto, não devem ser menosprezadas, já que estes animais podem ser portadores subclínicos da *Ehrlichia canis* (WARDROP, 2010).

Na fase aguda da doença a trombocitopenia é a alteração mais evidente, envolvendo diversos mecanismos inflamatórios e imunológicos, que levam a um aumento do consumo de plaquetas devido a altos valores séricos de anticorpos IgG antiplaquetários, presentes no endotélio vascular inflamado, além da diminuição das plaquetas devido ao sequestro esplênico (SOLANO-GALLEGO, 2015). No esfregaço sanguíneo pode se visualizar mórulas no citoplasma de leucócitos ou plaquetas (HARRUS, 2000).

Em relação às proteínas plasmáticas a hipoproteinemia pode indicar estados de subnutrição, bem como de insuficiência ou lesão hepática e hemorragias. As proteínas sanguíneas são sintetizadas principalmente pelo fígado, sendo que a taxa de síntese está diretamente relacionada com o estado nutricional, especialmente com os níveis de proteínas e com a funcionalidade hepática. A hiperproteinemia, por sua vez, obteve associação com a infecção e pode estar associada às doenças ou processos inflamatórios que estimulam a síntese de certas imunoglobulinas alterando a produção protéica (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

A fase crônica vem acompanhada de monocitose, linfocitose, com linfócitos podendo conter grânulos azurofílicos, trombocitopenia, anemia não regenerativa, pancitopenia e gamopatia monoclonal (GREENE, 2012). Segundo Gregory e Forrester (1990) na fase crônica da erliquiose, a linfopenia e leucopenia estão entre as principais características encontradas. A linfopenia geralmente é atribuída à resposta aos esteróides, ocorrendo em resposta às principais doenças sistêmicas, aos distúrbios metabólicos e à dor. A leucopenia pode ocorrer devida á imunossupressão do animal durante a fase crônica da doença (THRALL, 2011).

A evolução da doença leva à aplasia de medula, diminuindo a produção de hemácias e plaquetas, conseqüentemente, gerando anemia não regenerativa, normocítica e normocrômica, acompanhada de leucopenia e trombocitopenia (BAKER, 2015). Quando o animal não desenvolve uma resposta imune eficiente ao microrganismo ocorre hipoplasia medular ocasionando também monocitopenia, linfopenia e leucopenia (GREGORY e FORRESTER, 1990).

De acordo com Keer (2003) e González (2006) os aumentos de proteínas totais podem ser causados por dois motivos principais: desidratação e inflamação, sendo a inflamação acompanhada de hipoalbuminemia e hiperglobulinmia, enquadrada na resposta inflamatória de fase aguda. A hiperproteinemia segundo Nakaghi et al. (2008) é um achado comum devido ao

aumento das gamaglobulinas, e o aumento das enzimas AST e ALT pode decorrer de dano hepático ou do estresse sistêmico provocado pela EMC.

A *E. canis* dentro do hospedeiro definitivo circula pelo organismo, concentrando-se em órgãos do sistema mononuclear fagocítico como baço, linfonodos e fígado, o que ocasiona linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia por hiperplasia linforreticular. O patógeno promove ainda interação com as células do endotélio vascular, causando vasculite, desordens imunológicas e inflamatórias que suprimem a atividade microbicida de macrófagos, causam hemaglutinação, infiltração leucocitária em diversos órgãos como rins, baço, fígado, olhos, além de iniciar a produção de anticorpos antiplaquetários (FELDMAN et al., 2000; AGUIAR, 2015; MCVEY et al., 2016).

3.9 Alterações Bioquímicas

As alterações bioquímicas mais frequentes em cães com erliquiose são hiperproteinemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. A hiperproteinemia resulta do aumento sérico das globulinas e dos anticorpos. A hiperglobulinemia geralmente é policlonal, mas também pode surgir hiperglobulinemia associada às gamopatias monoclonais. Esta resposta humoral exacerbada está também associada às consequências mais graves da EMC crônica, como a síndrome de hiperviscosidade e a glomerulonefrite. Também podem estar presentes elevações das atividades de aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e alanina aminotransferase (ALT) (MOONARMART, 2014), discreta elevação dos níveis séricos de bilirrubina sem icterícia, albumina e proteínas total na fase aguda (ALMOSNY, 1998), além de um aumento nas concentrações séricas de uréia, creatinina e fósforo (TROY, 2006).

A hipoalbuminemia ocorre em associação com uma nefropatia que pode culminar com a perda de proteínas que se denomina síndrome nefrótica. Outros achados laboratoriais importantes incluem proteinúria, hematúria e alterações como aumento do tempo de coagulação (LITTLE, 2010).

Animais infectados pela *E. canis* podem ter lesão renal por depósito antígeno-anticorpo provocando glomerulopatias (WOOD et al., 1991; ALMOSNY e MASSARD, 2002; KANEKO et al., 2008; SANTOS et al., 2009). Porém o aumento das enzimas renais ocorre apenas quando aproximadamente 75% dos néfrons já foram lesados (KANEKO et al., 2008; SANTOS et al., 2009).

Na fase aguda da doença pode ocorrer aumento de uréia que está relacionado também com alterações no metabolismo do nitrogênio, febre e catabolismo proteico (ALMOSNY e MASSARD, 2002; KANEKO et al., 2008; SANTOS et al., 2009). As alterações da ALT ocorrem mais comumente em lesão de processos agudos e geralmente em processos de hepatopatias crônicas a enzima pode estar dentro da faixa de normalidade (KANEKO et al., 2008; SANTOS et al., 2009). A presença de hipoalbuminemia, aumento da fosfatase alcalina, assim como da aspartato aminotransferase, hiperglobulinemia, hiperfosfatemia e hipocalcemia são achados em cães infectados pela *Ehrlichia canis* (ESARTE, 2010).

3.10 Diagnóstico

O diagnóstico da erliquiose canina é feito baseado na associação dos achados clínicos, provas laboratoriais, sorológicas e moleculares. Desta forma, quanto mais precoce for o diagnóstico, haverá mais condições de se realizar um tratamento adequado da doença (MUNHOZ et al., 2012).

Os achados clínicos e a trombocitopenia têm sido usados como um teste de triagem em regiões endêmicas (HARRUS et al., 2012). Na avaliação do esfregaço sanguíneo, diversos agentes transmitidos por vetores podem ser encontrados. As mórulas observadas em leucócitos e plaquetas confirmam o diagnóstico de anaplasmosose ou erliquiose (LEAL et al., 2012). A baixa parasitemia nos animais assintomáticos ou com doença crônica poderá determinar o insucesso desta técnica, sendo indicado para esses casos aspirados de medula óssea ou esplênico (MOREIRA et al., 2003).

Não sendo observados os parasitos em estiraço de sangue, o diagnóstico sorológico não deve ser descartado utilizando-o como apoio nas fases subclínica e crônica da doença, assim como se utiliza na fase aguda da doença a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (MIRANDA et al., 2011).

A infecção pela *Ehrlichia canis* resulta no desenvolvimento de anticorpos específicos, que podem ser observados na circulação sanguínea em sete dias (IgM) a quinze dias (IgG) após a infecção os animais que entram na fase subclínica permanecem com o nível de anticorpos elevados que pode indicar persistência da infecção e estímulo antigênico crônico (WANER et al., 2001).

Os testes sorológicos detectam os anticorpos reativos presentes no soro e não a presença do organismo em circulação, portanto um título de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* positivo confirma a exposição ao organismo, mas não a presença de infecção. Neste contexto títulos negativos não descartam impossibilidade de doença tendo em vista que ainda não ocorreu tempo suficiente à formação de anticorpos. Para tentar contornar tais limitações deve-se sempre coletar duas amostras com intervalo de duas a quatro semanas (LEAL et al., 2012).

As técnicas sorológicas mais usadas para a pesquisa de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* são a imunofluorescência indireta (IFI) e o ELISA (NICHOLSON, 2003). A IFI consiste basicamente na reação do antígeno (*E. canis*) fixado em lâmina de microscopia com anticorpos de soros de animais infectados. A detecção da reação é com conjugado marcado com isotiocianato de fluoresceína visualizada num microscópio com filtros de 540nm para detecção de fluorescência. De acordo com a padronização da técnica, a presença de títulos de anticorpos anti-*E. canis* em diluição superior a 1:40 é considerada como indicador de exposição do hospedeiro ao agente (AGUIAR et al., 2007).

Devido às diferentes metodologias laboratoriais, não existe consenso quanto ao título mínimo de anticorpos que evidencie exposição ao agente patogênico, considerando-se geralmente um título ≥ 40 ou ≥ 80 . Desta forma, as titulações de 1:40, ou superiores, são evidência de exposição ao agente. Dois resultados consecutivos, com duas semanas de intervalo, que demonstrem um aumento igual ou quatro vezes superior ao valor da primeira titulação, são indicativos de infecção ativa (HALOS, 2015).

Um aspecto negativo da IFI para erliquiose é a possibilidade de ocorrer reações cruzadas, especialmente entre *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*. Por isso, a IFI apresenta especificidade baixa, embora possua boa sensibilidade. Essa baixa especificidade torna-se ainda mais crítica com soros de títulos baixos em animais na fase crônica e animais tratados ($< 1:160$) (FISHMAN et al., 2004).

O teste ELISA é outro método sorológico possível para diagnóstico envolve a ligação de enzimas, que são marcadas com antígenos ou a anticorpos. Dois métodos básicos são utilizados: o teste de ELISA direto e o teste de ELISA indireto. O teste de ELISA direto utiliza-se da detecção do antígeno e o indireto na detecção de anticorpos. A especificidade do teste ELISA indireto (FIGURA 7) é idêntica à da IFI. O Dot-ELISA (DotBlot) é uma técnica sorológica direta sensível e específica para detecção de anticorpos no soro e não requer estrutura laboratorial

sofisticada. Assemelha-se ao ELISA indireto, diferindo somente pela adsorção do antígeno a uma membrana de nitrocelulose. A leitura do resultado é visual e a interpretação é simples e o resultado da reação permanece registrado na membrana de nitrocelulose, permitindo uma conferência posterior dos dados. Este teste é o que está disponível para utilização *in situ* nas clínicas e hospitais veterinários, a especificidade apresentada é elevada, variando entre 0,98-1,00, conforme a marca do teste utilizado. Estes testes possuem sensibilidade para detectar titulações de 1:100 ou superiores (WANER et al., 2001; HARRUS et al., 2002).

O teste de ELISA é bastante utilizado, visto que é considerado o método de diagnóstico de maior praticidade e menor custo, entretanto, se vê com frequência com resultados falso-positivos. Isto se deve ao fato deste teste detectar anticorpos, diagnosticando como positivos os animais que estão ou já estiveram em contato com o antígeno (ALMOSNY, 1998; FIGUEIREDO et al., 2011). A tecnologia SNAP® da IDEXX foi desenvolvida para uso em clínicas veterinárias, com base no teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para detecção de antígenos/anticorpos em sangue ou fezes de animais (IDEXLAB, 2015).

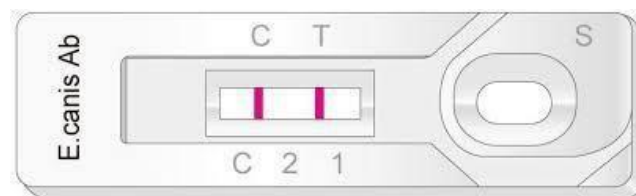


Figura 7- SNAP® ALERE

Fonte: ALERE (2019).

O Canine Snap 4Dx® Plus é um kit de diagnóstico rápido baseado na metodologia ELISA que detecta anticorpos contra *E. canis*, *Anaplasma spp.*, *Borrelia burgdorferi* e antígeno da *Dirofilaria immitis* e para Bowman et al. (2009) e Diniz et al. (2009) apresentam bons resultados quando comparados à Reação em cadeia polimerase (PCR) e RIFI. Estudos realizados por Diniz et al. (2009) utilizando 4Dx® Plus como técnica de diagnóstico para *E. canis* obteve acurácia de 81,5%.

Harrus et al. (2002) ao compararem três kits de ELISA com a técnica de RIFI, não encontraram diferenças significativas entre os testes, o que possibilitou a conclusão que os primeiros são específicos e sensíveis, principalmente para títulos maiores que 1:320. O SNAP

Test apresentou sensibilidade e especificidade de 71% e 100%, respectivamente, quando comparado à RIFI.

Os resultados obtidos pelo 4Dx® Plus devem ser interpretados considerando-se os achados clínicos e laboratoriais, tendo em vista que resultados falso negativos podem ser relatados em infecções agudas, o que necessita de novos testes com intervalo de 21 dias entre eles (IDEXLAB, 2015).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é um método de diagnóstico extremamente eficaz, já que detecta o material genético da bactéria no sangue ou em órgãos do hospedeiro. Esta técnica permite a síntese de grandes quantidades de fragmentos de ácido desoxiribonucleico (DNA) sem recorrer à clonagem. A chave deste processo é o uso de uma DNA polimerase termoestável, que permanece ativa durante os vários ciclos de aquecimento. Depois de amplificado o DNA é lido por eletroforese em gel. Hoje esta técnica é uma realidade para alguns dos médicos veterinários (SILVA, 2015).

A técnica molecular de PCR é um meio adequado para a detecção do DNA de *Ehrlichia canis* no soro mesmo antes da soroconversão, facilitando o diagnóstico prematuro da erliquiose canina, quando naqueles ainda não se houve tempo para produção de anticorpos contra a bactéria se tornando os animais falsos negativos quando avaliados pelo método sorológico devendo ser usada em conjunto com técnicas sorológicas, no entanto a técnica de PCR consiste numa técnica de alto custo e não é utilizada ainda na rotina de clínicas veterinárias (ANDRÉ et al., 2015).

3.11 Tratamento

Embora a terapêutica para erliquiose seja indicada e muitas vezes apresente sucesso quando corretamente aplicada e com a devida antecedência, é importante salientar que animais tratados corretamente podem mesmo assim permanecer infectados pela *Ehrlichia canis* (STICH, 2010). Um animal pode ser considerado livre da doença quando se observa recuperação clínica e melhora das alterações hematológicas e bioquímicas com resolução da hiperproteinemia, podendo, no entanto, permanecer infectado (LAPPIN, 2002).

A minociclina na dose de 10mg/kg, via oral duas vezes ao dia durante 28 dias pode ser utilizada, assim como a tetraciclina na dose de 22 mg/kg, via oral três vezes ao dia durante 28 dia ou a oxitetraciclina na dose de 25 mg/kg, via oral três vezes ao dia durante 28 dias por serem

lipossolúveis. No entanto, a droga de eleição é a doxiciclina na dose de 10mg/kg, via oral uma vez ou duas vezes ao dia durante 28 dias (BREITSCHWERDT, 2007).

A doxiciclina em particular apresenta uma excelente penetração na barreira hematoencefálica e maior tempo de meia-vida que os restantes princípios ativos referidos. A utilização do cloranfenicol na dose de 15-25 mg/kg, via oral três vezes ao dia durante 28 dias é recomendada em casos de infecções persistentes após tentativa fracassada de terapêutica com tetraciclina, sendo por isso usado como recurso (KENNY, 2005).

A utilização de glicocorticóides em doses imunossupressoras, como a prednisolona a 2 mg/kg, durante dois a sete dias pode ainda ser benéfica e é aconselhada no período inicial do tratamento, na presença de trombocitopenia severa, devido ao carácter imunomediado (SOLANO-GALLEGO, 2015).

Além dos princípios terapêuticos convencionais para o tratamento da erliquiose, em animais desidratados deve-se instituir sempre um protocolo de fluidoterapia e nos severamente anêmicos, sempre que possível, é importante realizar a transfusão sanguínea, e o uso de estimulantes do apetite, nos casos de anorexia com o uso das vitaminas do complexo B ou até diazepam para auxiliar a recuperação (SOLANO-GALLEGO, 2015).

3.12 Profilaxia

O ponto mais importante de todas as medidas profiláticas é o controle dos vetores que transmitem agentes hemoparasitas aos hospedeiros vertebrados. Existem diversos produtos atualmente disponíveis para o controle dos carrapatos, contudo é importante levar consideração às características biológicas dos ciclos de vida do agente transmissor, uma vez que apenas 5% dos carrapatos se encontram efetivamente no cão, e 95% no meio ambiente. Assim, a estratégia de controle deve contemplar o animal e sempre o ambiente em que este se insere, pois medidas de controle que foquem apenas um destes elementos, serão insuficientes (DANTAS-TORRES, 2008).

O *Rhipicephalus sanguineus* tirou proveito do aquecimento central para propagar-se e nas zonas temperadas, onde ele gera muitas vezes populações enormes em abrigos, canis e hospitais veterinários; durante o inverno, ele não consegue sobreviver no meio externo no Norte. Os cães que vivem em regiões temperadas adquirem com frequência este artrópode nesse tipo de instalação infestada, mas durante o verão, a infestação pode ocorrer ao ar livre. Em consequência,

para a obtenção de resultados duráveis, a eliminação desses carrapatos deve incluir o tratamento acaricida tanto nos cães, quanto no ambiente em que estes vivem, portanto, três tipos de controle químico, mecânico e biológico (BOWMAN, 2010).

O tratamento químico compreende a utilização de drogas feitas para uso oral como o fluralaner e afoxalaner, que tem uma boa eficácia, assim como coleiras impregnadas de imidaclopride a 10% e flumetrina a 4,5% com eficácia de 100% quando comparadas as coleiras de deltametrina. Ainda existem outros fármacos utilizados em spray, e spot-on, além de compostos de propoxur, carbaril e organofosforados e carbamatos utilizados no controle do meio ambiente. O controle mecânico é feito retirando os carrapatos do animal através de trabalho manual e escovação. O controle biológico compreende fechar frestas e fendas no ambiente onde vive o animal evitando que os carrapatos tenham um local para ficar e controlar a vegetação (LARSEN, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e critérios de inclusão

Foram avaliados 20 cães de diferentes sexos, variadas raças e idades, provenientes dos atendimentos realizados no Hospital Veterinário da Prefeitura de Recife PE no período de setembro de 2017 a maio de 2018.

Cada tutor foi informado a respeito da pesquisa, e após a devida autorização foi realizada a coleta de dados com o preenchimento de ficha individual, contendo dados epidemiológicos e alterações clínicas, seguido pelo exame físico de cada animal.

Como critério de inclusão na pesquisa, os animais deveriam ser positivos ao teste sorológico e apresentar sinais clínicos sugestivos da doença, como apatia, anorexia, vômito, febre, distúrbios hemorrágicos, palidez de mucosas, secreção ocular ou nasal, perda de peso, lesões oculares, linfadenopatia, esplenomegalia e dispneia (MOREIRA et al., 2003; CASTRO et al., 2004; BORIN et al., 2009).

4.1.1 Comissão de Ética

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) sob Decisão 125/2017.

4.2 Coleta de Sangue

A coleta de sangue foi realizada por meio da venopunção utilizando-se seringas descartáveis. Foram coletados 4 ml de sangue, 1,5 ml foi acondicionado em tubos plásticos tipo erppendof[®] contendo anticoagulante para a realização do hemograma e do teste sorológico. A amostra restante foi acondicionada em tubo sem anticoagulante para realização dos exames bioquímicos.

4.3 Hemograma

O hemograma foi realizado com o auxílio de analisador hematológico veterinário (pocH-100iV-Diff-Roche[®]); a morfologia celular e a contagem diferencial das células foi realizada após a confecção de esfregaços sanguíneos, as lâminas de vidro foram coradas pelo método panótico rápido (Instat-Prov[®]-Newprov) e com base nos valores de referência de Kaneko(2008).

4.4 Bioquímica sérica

Para as análises bioquímicas, foram transferidos 2,5 ml de sangue para um tubo plástico tipo Vacutainer[®] sem anticoagulante, que foi posteriormente centrifugado. Após a formação do coágulo, a amostra foi colocada em centrífuga Excelsa Baby II modelo 206-R[®] (Fanem, São Paulo-Brasil) com a velocidade de 500 G durante 10 minutos para a obtenção do soro.

As análises bioquímicas foram realizadas em analisador bioquímico automático Labmax 240[®], com a utilização de kits comerciais (Labtest Diagnóstica, MG, Brasil), de acordo com as técnicas descritas a seguir: ácido ALT (alanina aminotransferase): método cinético UV – IFCC; AST (aspartato aminotransferase): método cinética UV – IFCC; ureia: método enzimático colorimétrico; creatinina: método Labtest – reação de Jaffé; icrato sem precipitação; cálcio: método arsenazo III; Fósforo: método Labtest (fosfomolibdato, molibdato); e potássio: método enzimático em modo cinético.

4.5 Sorologia

A amostra utilizada foi uma alíquota de 3 gotas de sangue total com 4 gotas do reagente, após a homogeneização de 10 segundos a amostra foi conduzida para o dispositivo do Snap, despejada no poço do dispositivo que fluiu através da janela de resultados sendo feita sua leitura

após 30 segundos para identificação dos anticorpos anti *Ehrlichia canis*. Foram utilizados kits comerciais da Alere ® para testar os animais com anticorpos anti –*Ehrlichia*.

5 Análise Estatística

Os dados foram analisados descritivamente através de frequências absolutas e percentuais para as variáveis consideradas em categorias e das medidas média, desvio padrão (média \pm desvio padrão), valor mínimo e valor máximo quando as variáveis foram consideradas numericamente. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IBM SPSS na versão 23.

6 Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta os resultados em valores absolutos e relativos relacionados com a sintomatologia clínica dos 20 animais positivos na sorologia para *Ehrlichia canis*. Observou-se nesta pesquisa que 75% dos animais apresentaram apatia, 50% vômito, 45% secreção ocular e 5% distúrbio hemorrágico. Estes resultados estão de acordo com Halos (2015) que afirmou que os cães infectados pela *Ehrlichia canis* podem apresentar sintomatologia variada, dependendo da fase da doença em que se encontram e o quadro clínico pode variar de sinais clínicos graves até à inexistência de quaisquer sinais clínicos.

Quanto aos sinais clínicos os resultados se assemelham aos de França (2017) que observou como sinais clínicos mais comuns em cães positivos sorologicamente para *Ehrlichia canis*: anorexia, perda de peso, letargia, edema de membros, emese, dispneia, mucosas pálidas, tendências a hemorragias como petéquias, equimoses e epistaxe, em decorrência de trombocitopenias, disfunção plaquetária e vasculite. alterações oftálmicas e renais, apatia com suscetibilidade a infecções secundárias devido ao comprometimento da imunidade do animal também são sinais observados.

Waner (2013) afirmou que a gravidade da doença depende de diversos fatores e um deles é a capacidade imunológica do hospedeiro vertebrado e ou a presença de outros agentes concomitantes, nomeadamente parasitoses provocadas por ixodídeos.

Silva (2014) relatou que vômito e secreção ocular são sinais não característicos da doença podendo ser encontrados em fase crônica e aguda da erliquiose canina. Distúrbios de coagulação como epistaxe, petéquias e equimoses são sinais clínicos comuns em fases aguda e crônica da doença. Um achado incomum nesta pesquisa foi ter a presença de apenas um animal com distúrbio hemorrágico, no entanto os achados clínicos dependem da fase da doença e da severidade da mesma (FRANÇA, 2017).

Tabela 1 – Resultados em valores absolutos e relativos da sintomatologia clínica de cães naturalmente infectados e positivos na sorologia para *Ehrlichia canis*.

| Variável | Sim | | Não | |
|--------------------------------|-----|----|-----|----|
| | n | % | N | % |
| Apatia | 15 | 75 | 5 | 25 |
| Vômito | 10 | 50 | 10 | 50 |
| Distúrbios hemorrágicos | 1 | 5 | 19 | 95 |
| Secreção ocular | 9 | 45 | 11 | 55 |

A Tabela 2 apresenta os resultados com a média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo dos dados hematológicos dos 20 cães naturalmente infectados e positivos na sorologia para *Ehrlichia canis*. Observou-se uma variabilidade elevada nas variáveis bastonetes e eosinófilos com valores dos desvios padrão superiores às médias correspondentes. E foram razoavelmente elevados o desvio padrão nas variáveis segmentados, linfócitos e monócitos.

Tabela 2 – Resultados do perfil hematológico de cães naturalmente infectados e positivos na sorologia para *Ehrlichia canis*

| Variável | Média ± DP | Mediana | Mínimo | Máximo |
|--|-------------------|----------------|---------------|---------------|
| Hemácias (5,5-8,5 x10 ⁶ /ml) | 5,02 ± 1,54 | 4,86 | 2,48 | 7,99 |
| Hemoglobina (12-18g/dl) | 10,93 ± 3,82 | 10,55 | 5,00 | 19,30 |
| Hematócrito (37-55%) | 32,64 ± 11,90 | 31,30 | 10,00 | 57,40 |
| VCM (60-77fl) | 62,92 ± 10,27 | 64,72 | 22,70 | 71,80 |
| CHCM (32-36%) | 33,23 ± 0,77 | 33,24 | 32,15 | 34,87 |
| Plaquetas (200-500 x10 ³ /ml) | 130,67 ± 60,42 | 107,50 | 39,00 | 285,00 |
| PPT (5,5-8,0g/dl) | 7,88 ± 1,79 | 8,00 | 4,40 | 12,00 |
| Leucócitos (6.000-17.000 x 10 ³ /ml) | 8,02 ± 3,60 | 7,20 | 3,40 | 16,00 |
| Bastonetes | 483,40 ± 517,44 | 337,00 | 0,00 | 2244,00 |

| | | | | |
|-------------------------------------|-------------------|---------|---------|----------|
| (0-300 x 10 ³ /ml) | | | | |
| Segmentados | 5402,20 ± 2737,87 | 4446,00 | 2108,00 | 11616,00 |
| (3.000-11.500 x10 ³ /ml) | | | | |
| Eosinófilos | 309,70 ± 412,44 | 166,50 | 0,00 | 1495,00 |
| (100-1.250 x 10 ³ /ml) | | | | |
| Linfócitos | 1598,35 ± 961,74 | 1291,00 | 627,00 | 4800,00 |
| (1.000-4.800 x 10 ³ /ml) | | | | |
| Monócitos | | | | |
| (150-1.350 x10 ³ /ml) | 179,85 ± 96,76 | 163,50 | 0,00 | 396,00 |

A média dos valores para hemácias hemoglobina e hematócrito se mostrou abaixo dos valores de referência evidenciando que a maioria dos animais desta pesquisa apresentava anemia. Resultados similares foram encontrados por Santos et al. (2009), Borin et al. (2009) e Vieira et al. (2011). É possível que esta alteração ocorra devido à ação de supressão medular orquestrada pelo sistema monocítico fagocitário em conjunto com o sistema complemento, que desencadeiam a supressão da eritropoiese medular desencadeando a anemia (KAKOMA et al., 1994, ALMOSNY e MASSARD 2002; NAKAGHI et al., 2008).

A anemia é uma alteração observada com frequência no hemograma de cães com erliquiose e é normalmente classificada como normocítica normocrômica e não-regenerativa, sugerindo ausência de resposta da medula óssea. A anemia pode ser devida à remoção dos eritrócitos circulantes pelo sistema monocítico-fagocitário, à ação do complemento na lise celular e à supressão da eritropoiese na medula óssea (MOREIRA et al., 2003). A anemia caracteriza-se pela redução no número de hemácias, ou no teor de hemoglobina, ou em ambos. É um reflexo de um estado patológico. Ocorre em razão a uma excessiva perda de sangue (hemorragias), destruição (hemólise), ou queda na produção de eritrócitos (BIRCHARD e SHERDING, 2003).

A maioria dos animais deste estudo apresentou anemia do tipo normocítica normocrômica e tais resultados discordam dos achados de cães naturalmente infectados pela *Ehrlichia canis* conforme citou Borin et al. (2009), os quais citam anemia normocítica hipocrômica.

Em relação ao leucograma, apenas os bastonetes apresentaram-se elevados nos animais desta pesquisa. Segundo Codner et al. (1985) quando o número de bastonetes estiver mais alto do que os segmentados, significa que a medula óssea não está conseguindo enviar para o sangue uma quantidade suficiente de neutrófilos maduros, liberando os imaturos, isso geralmente ocorre em processos inflamatórios e infecciosos mais graves. Se o aumento de bastonetes vier acompanhado por um aumento do número dos outros glóbulos brancos (eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) indica que o organismo está respondendo bem a uma inflamação ou infecção.

Harrus et al. (1997) afirmou que a monocitose é um achado frequente e é um forte indicativo da possibilidade de uma erliquiose mesmo antes da observação das mórulas no esfregaço sanguíneo, no entanto, Codner et al. (1985) afirmaram que a monocitose nem sempre é observada em animais com erliquiose canina. Então, sugere-se que a monocitose pode ou não aparecer nos animais positivos naturalmente infectados pela *Ehrlichia canis*, não sendo uma alteração hematológica específica.

Um estudo feito por Mendonça et al. (2002) no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia com 109 animais naturalmente infectados pela *Ehrlichia canis* foi observada uma grande amplitude de variação nos valores dos constituintes do eritrograma e do leucograma, embora inespecíficos, os pacientes apresentaram trombocitopenia, anemia arregenerativa, eosinopenia, desvio nuclear de neutrófilos à esquerda, estes autores afirmaram que a amplitude das variações ocorreram pelos fatores inerentes a patogenicidade da cepa, curso da infecção, resposta individual dos animais e a presença de agentes infecciosos concomitantes.

Faria et al. (2005) em pesquisa realizada no Hospital Veterinário da UNESP/ Jaboticabal com 31 animais suspeitos de erliquiose, observaram que todos cães apresentaram trombocitopenia, 80% apresentaram anemia e 35% apresentaram leucopenia.

Em estudo realizado por Miranda et al. (2004) com 557 canídeos do Município de Campos dos Goytacazes, RJ, observou-se que 69 animais foram positivos em pesquisa de esfregaço sanguíneo, o que representa 12,4% dos animais. As principais alterações hematológicas

encontradas neste estudo foram trombocitopenia, anemia normocítica normocrômica, leucocitose neutrofilica com desvio à esquerda leve, linfopenia e eosinopenia.

Nesta pesquisa a trombocitopenia foi uma alteração muito frequente nos cães e a média foi de 107.50 na contagem de plaquetas. As plaquetas fazem parte do conjunto de componentes responsáveis pela hemostasia efetiva, além delas, existem também, os fatores de coagulação e a parede vascular que atuam nesse processo de controle do sangramento e manutenção do fluxo sanguíneo. São fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos em formato de disco plano (BAKER, 2015). Uma das primeiras formas de avaliação da hemostasia é a contagem de plaquetas, que nos cães pode variar de 200.000 a 500.000 plaquetas/ μ l (JAIN, 1993). Desta forma, quando a contagem de plaquetas é inferior ao valor mínimo de referência é dito que o animal apresenta um estado patológico, chamado trombocitopenia (TAKAHIRA e MATTOSO, 2015).

Jericó et al. (2015) afirmaram que a trombocitopenia está relacionada a perda de plaquetas circulantes, através da vasculite, em decorrência do aumento do consumo, destruição mediada por imunocomplexos ou de sequestro de plaquetas pelo baço em presença da infecção pela *E. canis* e esta fortemente presente em animais em fase aguda e subclínica da doença.

A trombocitopenia é o achado hematológico comum na erliquiose monocítica canina em todas as fases da enfermidade, com ocorrência em mais de 90% dos cães infectados. É proposto ainda que a infecção pela *E. canis* resulta em produção exacerbada de anticorpos antiplaquetas, que por sua vez seria uma das maiores causas de trombocitopenia vista na EMC (HARRUS et al., 1996; HARRUS et al., 2004). Também contribui para a ocorrência de trombocitopenia a presença do fator de inibição da migração plaquetária produzido por linfócitos ativados que são estimulados pela exposição a monócitos infectados, comprometendo a formação de pseudópodes das plaquetas, induzindo-as ao arredondamento, aglutinação e vazamento (HARRUS et al., 1997; KATARZYNA et al., 2011).

A Tabela 3 apresenta os resultados da bioquímica sérica (Proteínas plasmáticas totais, ureia, ALT, AST, FA, e Fósforo) e foi constatado que todas as variáveis encontraram-se dentro dos valores de referência. A variabilidade se mostrou elevada na variável fosfatase alcalina com valor do desvio padrão superior à média correspondente e foram razoavelmente elevadas nas variáveis uréia, creatinina e AST.

Tabela 3 – Perfil bioquímico de cães naturalmente infectados e positivos sorologicamente pela *Ehrlichia canis*.

| Variável | Média ± DP | Mediana | Mínimo | Máximo |
|-----------------------------------|-------------------|----------------|---------------|---------------|
| Ureia (10 -60mg//dl) | 43,80 ± 31,18 | 32,50 | 15,00 | 121,00 |
| Creatinina (0,5-1,5mg/dl) | 0,80 ± 0,51 | 0,68 | 0,43 | 2,74 |
| ALT (10-88UI/L) | 55,45 ± 51,69 | 37,00 | 10,00 | 206,00 |
| AST (10-88UI/L) | 44,20 ± 30,80 | 34,50 | 15,00 | 155,00 |
| Fosfatase alcalina (10-96UI/L) | 90,20 ± 100,29 | 52,50 | 24,00 | 414,00 |
| Albumina (2,3-3,8mg/dl) | 2,62 ± 0,68 | 2,60 | 1,60 | 3,70 |
| Cálcio (9-11,3 mg/dl) | 8,72 ± 1,36 | 8,73 | 6,50 | 12,00 |
| Fósforo (2,6 -6,2mg/dl) | 5,98 ± 1,31 | 6,30 | 2,50 | 7,44 |

A avaliação bioquímica sérica vem sendo utilizada extensivamente em Medicina Veterinária não somente para avaliação clínica individual, como também para avaliar populações de animais (PAYNE e PAYNE, 1987). Quando interpretados adequadamente, os resultados

forneem importantes informações em relação ao estado clínico do paciente, ao balanço nutricional, a situações deficitárias, a monitorações de tratamento e a prognóstico (GONZALES et al., 2001).

Estudos relatam que a ureia se eleva devido a alterações no metabolismo do nitrogênio, como febre e catabolismo protéico levando a um quadro de azotemia pré-renal o que não ocorreu com os animais deste estudo já que os valores de ureia. (SANTOS et al., 2009).

Segundo Jericó et al. (2015) as alterações nos valores de uréia e creatinina podem ser observadas em cães com diagnóstico parasitológico de erliquiose, babesiose ou anaplasose, no entanto, os animais podem estar infectados e não apresentarem tais alterações. Estes aumentos na ureia e creatinina são comumente encontrados nos casos em que existem danos teciduais renais devido a alterações circulatórias e/ou imunomediadas desencadeados na Erliquiose Monocítica canina.

Em relação a FA, os valores se mantiveram dentro dos padrões de referência, no entanto, a sua variabilidade se demonstrou elevada. Geralmente, os aumentos da atividade sérica da FA são de origem hepatobiliar, com exceção de animais em crescimento ou com doenças ósseas (MEYER et al., 1992).

Os valores de AST mostraram-se dentro dos padrões de referência, porém, sua variabilidade se apresentou elevada. Lesão hepatocelular ou estresse oxidativo sistêmico com consequente aumento das enzimas ALT, AST e FA, principalmente aumento concomitante de AST e ALT e alterações nos valores de albumina são condições acentuadas em infecções provocadas pela *Ehrlichia canis*. No entanto, tais alterações estão relacionadas com a fase da doença em que os animais se encontram, a virulência da cepa infectante, assim como o estado imunológico e idade dos animais (HARRUS, 1997).

Na Tabela 4 encontram-se os resultados segundo a classificação (baixo, normal e elevado) das variáveis (PPT, ureia, creatinina, ALT, AST, FA, albumina, cálcio e fósforo).

Tabela 4 – Valores absolutos e relativos segundo a classificação das variáveis PPT, ureia, creatinina, ALT, AST, FA, albumina, Ca e fósforo de cães naturalmente infectados positivos sorologicamente para *Ehrlichia canis*.

| Variável | Baixo | | Normal | | Elevado | |
|------------------------------|-------|------|--------|------|---------|------|
| | n | % | N | % | n | % |
| PPT (5,5-8,0g/dl) | 1 | 5,0 | 8 | 40,0 | 11 | 55,0 |
| Ureia (10-60mg/dl) | - | - | 16 | 80,0 | 4 | 20,0 |
| Creatinina (0,5-1,5mg/dl) | - | - | 19 | 95,0 | 1 | 5,0 |
| ALT (10-88 UI/L) | - | - | 17 | 85,0 | 3 | 15,0 |
| AST (10-88UI/L) | - | - | 18 | 90,0 | 2 | 10,0 |
| FA (10-96UI/L) | - | - | 17 | 85,0 | 3 | 15,0 |
| Albumina (2,3-3,8mg/dl) | 7 | 35,0 | 13 | 65,0 | - | - |
| Ca (9,0-11,3 mg/dl) | 10 | 50,0 | 9 | 45,0 | 1 | 5,0 |
| Fósforo (2,6-6,2mg/dl) | 1 | 5,0 | 16 | 80,0 | 3 | 15,0 |

As proteínas plasmáticas totais encontraram-se elevadas em 55% dos pacientes, seguido da variável ureia com 20%, ALT, FA e fósforo cada um com 15%. Valores inferiores à referência foram registrados em 50% dos pacientes com relação ao cálcio, 35% na albumina e 5% fósforo. Nas demais variáveis a maioria dos pacientes foi classificada com valor normal.

Os achados mais frequentes em bioquímica sérica na fase crônica da enfermidade incluem hiperproteinemia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, aumento da ALT e da FA. A hiperproteinemia resulta de níveis elevados de globulinas. Porém, não existe relação direta entre os níveis de globulina sérica e os níveis de anticorpos para *E. canis* (GREENE, 2012).

Keer (2003) e González (2006) afirmaram que os aumentos de proteínas totais podem ser causados por desidratação e inflamação, sendo a inflamação acompanhada de baixa albumina e aumento das globulinas, enquadrada na resposta inflamatória de fase aguda.

Segundo Costa et al. (2015) a hipoalbuminemia ocorre em consequência da diminuição na ingestão de proteínas causada pela anorexia, diminuição na produção de proteínas causadas por danos hepáticos em 10 -15 % dos animais ou perda destas proteínas na urina devido à lesão renal, enquanto a hiperglobulinemia encontra-se associada à resposta imune do hospedeiro em relação ao parasita.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que os sinais clínicos, e os resultados hematológicos e bioquímicos encontrados foram variados e são inespecíficos para o diagnóstico da *Ehrlichia canis* sendo necessário a utilização de outros meios diagnóstico como a sorologia.

8 REFERÊNCIAS

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD C.L. Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses. **1ª ed. LF Livros de Veterinária**, p.135, Rio de Janeiro, 2002.

ALENCAR, M. A. G.; FRANCISCO, M. M. S.; MUNDIM, E. C. S.; RAMALHO, P. C. D. ; SOUZA, J. N.; Incidência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiares*) de rua capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade Anápolis-GO. **Ensaio e Ciência: Ciências biológicas, agrárias e saúde, Valinhos**, v.12, n.2, p.107-115, 2008.

ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis* (Donatien e Lestoquard 1935): avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados. **Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ**. p.224, 1998.

AZEVEDO, S.S.; AGUIAR, D.M.; AQUINO, S.F.; ORLANDELLI, R.C.; FERNANDES, A.R.F.; UCHÔA, I.C.P. Soroprevalência e fatores de risco associados à soropositividade para *Ehrlichia canis* em cães do semiárido da Paraíba. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 1 p. 14-18, 2011.

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.44, p. 126-132, 2007.

ANDRÉ, M.R.; DUMLER, J.S.; HERRERA, H.M.; GONÇALVES, L. R.; SOUSA, K. C. M.; SCORPIO, D. G.; SANTIS, A. C. G. A.; DOMINGOS, I. H. MACEDO, G. C.; MACHADO, R. Z. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase chain reaction using the nicotinamide adeninedinucleotide dehydrogenase gamma subunit (nuoG) for *Bartonella* species indomesticated and stray cats in Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery** v.15, n. 5, p. 5, 2015.

BAKER, D. C. Diagnóstico das Anormalidades de Hemostasia. In: THRALL, M. A., *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. **2ª. ed. São Paulo: Roca**, p.394-439, 2015.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**. v.136, p.321–325, 2009.

BANETH, G. *et al.* Vector-Borne Diseases -constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum. **Parasitológic. Vector**. v. 5, p. 55, 2012.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.566-571, 2009.

- BREITSCHWERDT, E. B. As riquetsioses. In ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4 ed. São Paulo: Manole., Cap. 67. p. 543-553, 2007.
- BULLA, C. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Review.**, v.35, p.141–146, 2004.
- CARDOSO, L.; COSTA, A.; TUNA, J.; VIEIRA, L.; EYAL, O.; YISASCHAR-MEKUZAS, Y.; BANETH, G. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. **Veterinary Parasitology**, v.156, n. 7, p.199–204, 2008.
- CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, D. L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73–86, 2004.
- CODNER, E.C.; ROBERTS, R.E.; AINSWORTH, A.G.1985. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. **Veterinary Medicine Association**; v. 186, n. 9, p.166,1985.
- COSTA, M.P.; HORTA, R.S.; COURA, F.M.; SILVA, J.P.; VALENTE, P. C. L.G.; PAES, P.R.O. Bioquímica sérica de cães infectados por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Leishmania* sp. Serum Biochemistry in Dogs Infected with *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Leishmania* sp. **Acta Scientia e Veterinary**, v.43, n.1261, p.1-7, 2015.
- DANTAS-TORRES, F. Diagnóstico molecular de *Ehrlichia canis* em cães com alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas, no município de Ilhéus, Bahia. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/318792178> [accessed Dec 13 2018]. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.173-185, 2008.
- DINIZ, P.P.V.P.; MORAIS, H.S.A.; BREITSCHWERDT, E.B.; SCHWARTZ, D.S. Serum Cardiac Troponin I Concentration in Dogs with Ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 1136-1143, 2008.
- EBANI, V.V.; BERTELLONI, F. Serological evidence of exposure to *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in Central Italian healthy domestic cats. **Ticks Tick Borne Disises**. v.5, n. 6, p. 668-671, 2014 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.019>. PMID:25113987.
- ESARTE, M. Hepatozoonosis. En: Green, E. (Ed.). **Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos**, p. 319 -325, Buenos Aires. Intermedica, 2010.
- FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Lippincott Williams e Wilkins, p. 787, 2000.
- FIGUEIREDO, M. R. **Babesiose e erliquiose caninas**. p. 39, Monografia (Pós-graduação em Clínica Médica de Pequenos Animais)-Qualittas, Rio de Janeiro, 2011.

FRANÇA L.T.; PEREIRA A.B.A.; SILVA F.D.S.; LIMA C.A.A.; SIMAS A.K.S.M.; ROSÁRIO C. J.R.M.; MELO F.A. Avaliação comparativa entre as manifestações clínicas alterações hematológicas e bioquímicas de cães naturalmente infectados com *Ehrlichia canis* em São Luís, MA, **38º Congresso brasileiro da anclivepa**, RECIFE-PE,2017.

FORTES F.S.; SANTOS L.C.; CUBAS Z.S.; BARROS-FILHO I.R.; BIONDO A.W.; SILVEIRA I. LABRUNA M.B. E MOLENTO M.B. Anti-*Rickettsia* spp. antibodies in free-ranging and captive capybaras from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 31 n. 11 p. 1014-1018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011001100013>, 2011.

GREENE C.E. Ehrlichia and Anaplasma Infections. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. Elsevier, Saint Louis. cap. 26, p. 227-260, 2012.

GONZALES F.H.D.; CARVALHO V.; MOLLER V.A E DUARTE F.R. Perfil Bioquímico sanguíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Arquivo Faculdade Veterinária. UFRGS, v. 29, p.1-6, 2001.

GONZÁLEZ, J.L. Erosive colitis in experimental canine leishmaniasis. **Journal Veterinary Medicine**., v, 37, p. 377-382, 2006.

HARRUS S.; BARK H. E WANER T.E. Canine monocytic ehrlichiosis. **an update The Compendium Continuing Education**. 19(4): 431-444, 1997.

HARRUS, S. et al. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal. Clinical. Microbiological**., v. 37, p. 2745-2749, 2000.

HARRUS, S.; ALLEMAN, A.R.; BARK, H.; MAHAN, S.M.; WANER T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v.86, p.361-368, 2002.

HARRUS S. E WANER T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **Veterinary Journal**, v, 187, p. 292-296, 2011.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, v.187, n. 3, p. 292–296. 2012.

IDEXX LABORATORIES. Licenciado no **Ministério da Agricultura** sob o n 9.981/2014. REPRESENTANTE EXCLUSIVO NO BRASIL IDEXX BRASIL LABORATORIOS LTDA. São Paulo-SP. 2015.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. **Journal. Clinic. Microbiological**, p. 32, v. 1644–1649, 1994.

JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. **1ª. ed. Philadelphia: Lea e Febiger**, 1993.

JERICÓ, M. M.; NETO, J. P. A.; KOGIKA, M. M. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Roca, Capítulo 83. Principais Doenças Parasitárias em Cães e Gatos, p. 742-762, 2015.

KAKOMA, I.; CARSON, C.A.; RISTIC, M.; STEPHENSON, E.M.; HILDEBRANDT, P.K. E HUXSOLL, D.L. Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis, *Infection and immunity*, vol. 20, n. 1, p. 242-247, 1994.

KANEKO J.J.; HARVEY J.W. E BRUSS M.L. Clinical biochemistry of domestic Animals, **6 ed. Academic Press, New York**, 896p, 2008.

KERR, M. G.; Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia; **Tradução de Veterinary laboratory medicine** – São Paulo, 2003.

LABRUNA M.B. Ecology of rickettsia in South America. *Ann. N.Y. Acad. Science*. v. 1166, n. 1, p. 156-166, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>. PMID:19538276 .

LEAL P.D.S.; FLAUSINO W.; LOPES C.W.G. Diagnóstico de infecções concomitantes por *Neosporacanium*, *Babesia canis* e *Ehrlichia* spp. em canino adulto da raça Golden Retriever - Relato de caso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, p.47-51, 2012.

LEGATZKI, K.; JORGE, P. S. Erliquiose canina – **Clínica Veterinária, São Paulo**, ano 5, n 26, mar/abr 2002.

LITTLE, S.E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinical North American Small Animal Practice**., v. 40, n. 6, p. 11, 2010.

MAIA C.; RAMOS C.; COIMBRA M.; BASTOS F.; MARTINS A.; PINTO P.; NUNES M.; VIEIRA M.L.; CARDOSO L. E CAMPINO L. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. **Parasitology Vectors** v. 7 n. 115 p. 115, 2014. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-115>. PMID:24655431.

MEINKOTH, J.H.; CLINKENBEARD, K. Normal hematology of the dog. **In: FELDMAN, B.V. et al. Schalm's veterinary hematology. 5.ed.** cap.163. 1058p, 2000.

MEYER, D.; COLES, H. E.; RICH, L.J. Hepatic test abnormalities In: **Veterinary Laboratory Medicine. Philadelphia: W.B. Saunders**, p. 55-70, 1992.

MIRANDA, F. J. B.; FAJARDO, H. V.; ALBERNAZ, A. P.; MELO Jr., O. A.; MACHADO, J. A., (2004). Abordagem hematológica de canídeos portadores de Erliquiose canina no município de Campos dos Goytacazes, RJ. **Anais do XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses**. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 13 p. 396.

MIRANDA F.J.B.; ALBERNAZ A.P.; VIESTEL M.A.D.; JR O.A.M. E ALVES J. Infecção simultânea por *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* e vírus da cinomose canina. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v.3, p. 238-246, 2011.

MYLONAKIS, M.E, et al. Serum canine pancreatic lipase immunoreactivity inexperimentally induced and naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **Veterinary Microbiologic.**, v. 169, p. 198–202, 2014.

MOREIRA, S.M.; BASTOS, C.V.; ARAÚJO, R.B.; SANTOS, M.; PASSOS, L. M. F. Estudo retrospectivo (1998 a 2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.2, p.141-147, 2003.

MUNHOZ, T.D.; FARIA, J.L.; VARGAS-HÉRNANDEZ, G.; FAGLIARI, J.J.; SANTANA, A.E.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M. Experimental *Ehrlichia canis* infection changes acute-phase proteins. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.3, p.206-212, jul-sep, 2012.

NAKAGHI, A.C.H.; ARAÚJO, P.G.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R. E BALDANI, C.D. Erliquiose canina: aspectos clínicos, hematológicos, sorológicos e moleculares, **Ciência Rural**, v. 38 p. 766-770, 2008.

NEER, T. M.; GREENE, C. E. Canine monocytic granulocytic ehrlichiosis. **Infectious Disease of the Dog and Cat**. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 139-147, 1998.

NELSON R.W. e COUTO C.G. Doenças riquetsiais polissêmicas. **Medicina interna de pequenos animais**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. cap. 96, p. 1322-1335, 2010.

OLIVEIRA C.S.; BRÄUNIG P.; KRAWCZAK F.; LABRUNA M.B.; BOTTON S.A.; VOGEL F.S.F. E SANGIONI L.A. 2017. Detecção de proteínas imunorreativas de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.37, n.1, p.52-57, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2017000100009>.

OLIVEIRA, D. et al. *Ehrlichia canis* antibodies detection by “DOT ELISA” in naturally infected dogs. **Revista Brasileira Parasitologica Veterinaria**. v. 9, p. 1-6, 2000.

ORIÁ, A. P.; PEREIRA, P. M.; LAUS, J. L. Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1289-1295, 2004.

PAYNE, J.M. E PAYNE, S. The Metabolic Profile Test. New York, **Oxford University Press**, p. 179, 1987.

PIRES, D. R.; PEREIRA, B. B. N.; AZEVEDO, L. A.; FRECHETTE, M. F.; COELHO, P. S. J.; ABOUD, L. C. S. Hemoparasitosis occurrence in dogs and cats assisted in unidade de diagnóstico e vigilância, **fiscalização sanitária e medicina veterinária** 2011. [online]. Disponível em: www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/342.pdf. Acesso em 20 de agosto de 2018.

RENÉ-MARTELLET, M. et al. Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. **Parasitologic Vectors**. v. 6, p. 1-3, 2015.

RIKIHISA, Y. Diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis: Development of advanced techniques to combat a global disease – Guest Editorial, **The Veterinary Journal** v.187, n. 3, p. 1-2, 2011.

SANTOS F.; COPPEDE J.S.; PEREIRA A.L.A.; OLIVEIRA L.P.; ROBERTO P.G.; BENEDITTI R.B.R.; ZUCOLOTO L.B.; LUCAS F., SOBREIRA L.; MARINS M. Molecular evaluation of the incidence of Ehrlichia canis, Anaplasma platys and Babesia spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Veterinary Journal**, v.179, p. 145-148, 2009.

SAINZ Á., ROURA X.; MIRÓ G.; ESTRADA-PEÑA A.; KOHN B.; HARRUS S E SOLANO-GALLEGO L. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasites and Vectors**, v.8, n.7, p. 75, 2006.

SANTAMARIA, et al. Molecular Diagnosis and Species Identification of Ehrlichia and Anaplasma Infections in Dogs from Panama, Central America. **Vector Borne Zoonotic**. , v.14, n.5, 2014.

SCHETTERS, T.P.; KLEUSKENS, J.A.; VAN DE CROMMERT, J.; DE LEEUW, P.W.; FINIZIO, A.L.; GORENFLOT, A. Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with Babesia canis; a haematological study. **Veterinary Parasitology**. v. 162, n.5, p. 7–15, 2009.

SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**. v.17, n.2, p. 74-78, 2008.

SILVA, V.C.L. **AVALIAÇÃO CLÍNICA, EPIDEMIOLÓGICA E LABORATORIAL DE CÃES (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) COM CINOMOSE, ERLIQUIOSE E BABESIOSE NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFRPE**. 2014 p25. Tese (doutorado em medicina veterinária)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife,

SILVA, I. P. M. Ehrlichiosis Canine - Literature Review. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v.7, n. 3, p. 23, 2015.

SOUSA, V. R. F.; ALMEIDA, A. D. B. P. F.; BARROS, L. A.; SALES, K. G.; JUSTINO, C. H. S.; DALCIN, L. E BONFIM, T. C. B. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1309-1313, 2010.

TAKAHIRA, R. K.; MATTOSO, C. R. S. Distúrbios da hemostasia. In: JERICÓ, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. 1ª. ed. São Paulo: Roca, v. 2, Cap. 205-207, p. 1870-1894, 2015.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. Terceira Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2010.

VILLAESCUSA, A. et al. Evaluation of lymphocyte populations in dogs naturally infected by *Ehrlichia canis* with and without clinical signs. **Ticks and Tick borne** . v. 3, p. 278– 281, 2012.

VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.M.S.; SANTOS, A.P.; SANTOS, R.P.; DUTRA, L.H.; DINIZ, P.P.V.P.; MORAIS, H.A.; MESSICK, J.B.; LABRUNA, M.B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011;

WANER, T. et al. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology Immunopathology**. v. 48, p. 177-182, 1995.

WANER, T. et al. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 69, p. 307-317, 2013.

WANNER T.; KEYSARY A.; BARK H.; SHARABANI E.; HARRUS S. Canine monocytic ehrlichiosis– an overview. **Israel Journal Veterinary Medicine**. v. 54, p.103-107, 2011.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic Ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**. v. 95, p.1-15, 2001.

WOODY B.J.; HOSKINS J. D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, p. 75-98, 1991.